

new

09/856924

700/06767

PCT/JP00/0070

SSA

4

29.09.00

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

EKU

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1999年11月19日

REC'D 17 NOV 2000

出願番号  
Application Number:

平成11年特許願第330065号

WIPO

PCT

出願人  
Applicant (s):

ナノキャリア株式会社

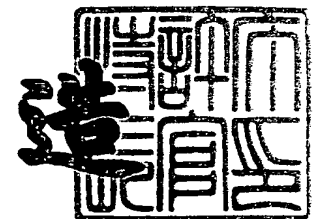
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年11月 6日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特 2000-3090022

【書類名】 特許願

【整理番号】 9911073

【提出日】 平成11年11月19日

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特  
許出願

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C08G 65/32  
A61K 47/48

【発明者】

    【住所又は居所】 千葉県柏市大室 1 0 8 3 - 4

    【氏名】 片岡 一則

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都足立区新田 3 - 3 2 - 1 0 諏訪ハイツ 4 0 0 号室

    【氏名】 柿澤 資訓

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都文京区根津 2 - 1 4 - 2 1 福島マンション 2 0 2

    【氏名】 原田 敦史

【特許出願人】

    【識別番号】 597144679

    【氏名又は名称】 ナノキャリア株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100060782

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 小田島 平吉

【選任した代理人】

    【識別番号】 100094293

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 藤井 幸喜

【選任した代理人】

【識別番号】 100103311

【弁理士】

【氏名又は名称】 小田嶋 平吾

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 019666

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 コアーシェル構造のポリイオンコンプレックスミセル

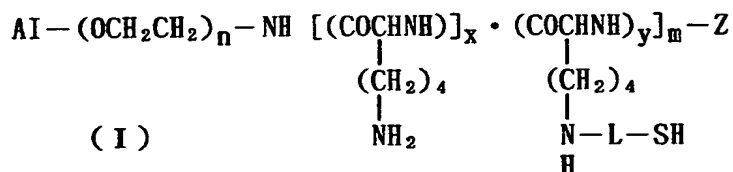
【特許請求の範囲】

【請求項 1】 親水性セグメントおよび荷電性セグメントを含むブロック共重合体と高分子電解質とから形成されるコアーシェル構造のポリイオンコンプレックスミセルの安定化方法であって、コア部を形成するブロック共重合体荷電性セグメントに少なくとも 1 個のチオール残基を担持させ、該荷電性セグメント間で、それらに担持させたチオール残基を介するジスルフィド結合の架橋を形成させることを特徴とする前記安定化方法。

【請求項 2】 ブロック共重合体の親水性セグメントがポリ（エチレングリコール）を含んでなり、そして荷電性セグメントがポリアミンまたはポリカルボン酸を含んでなり、かつ高分子電解質がポリペプチド、ポリプソイドペプチドおよびポリヌクレオチドからなる群より選ばれる請求項 1 記載の安定化方法。

【請求項 3】 ブロック共重合体が一般式（I）

【化 1】



式中、AI は水素原子またはアニオン重合開始剤の有機残基を示し、

Z は水素原子または式-L-SH の残基を示し、

L は C<sub>1-20</sub> アルキレン、C<sub>1-6</sub> アルキルフェニル、C<sub>1-6</sub> アルキルフェニレン-C<sub>1-6</sub> アルキル、フェニレンおよびカルボニル-C<sub>1-20</sub> アルキルからなる群より選ばれる連結基を示し、

n は 5 ～ 20,000 の整数であり、

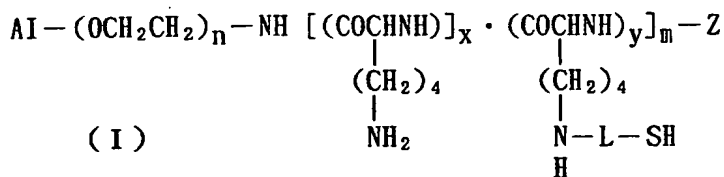
m は 5 ～ 10,000 の整数であり、そして

x の単位と y の単位の割合は 20 : 1 ～ 1 : 2 である、

で表される請求項 1 または 2 記載の安定化方法。

【請求項 4】 一般式（I）

## 【化 2】



式中、A I は水素原子またはアニオン重合開始剤の有機残基を示し、

Z は水素原子または式  $-\text{L}-\text{SH}$  の残基を示し、

L は  $\text{C}_{1-20}$  アルキレン、 $\text{C}_{1-6}$  アルキルフェニル、 $\text{C}_{1-6}$  アルキルフェニレン- $\text{C}_{1-6}$  アルキル、フェニレンおよびカルボニル- $\text{C}_{1-20}$  アルキルからなる群より選ばれる連結基を示し、

n は 5 ～ 20,000 の整数であり、

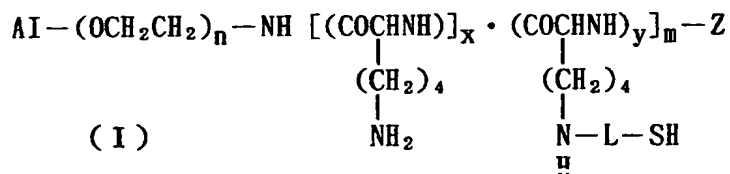
m は 5 ～ 10,000 の整数であり、そして

x の単位と y の単位の割合は 20 : 1 ～ 1 : 2 である、

で表されるブロック共重合体と高分子電解質とから形成されたコア-シェル構造のポリイオンコンプレックスミセルであって、水性媒質中でコア部を形成する該ブロック共重合体のポリアミンセグメント（式（I）で m の繰り返し単位を持つセグメント）と高分子電解質とがイオン対を形成しており、そして該セグメント内の少なくとも 1 個のチオール残基を介して該共重合体が架橋していることを特徴とするポリイオンコンプレックスミセル組成物。

【請求項 5】 一般式（I）

## 【化 3】



式中、A I は水素原子またはアニオン重合開始剤の有機残基を示し、

Z は水素原子または式  $-\text{L}-\text{SH}$  の残基を示し、

L は  $\text{C}_{1-20}$  アルキレン、 $\text{C}_{1-6}$  アルキルフェニル、 $\text{C}_{1-6}$  アルキルフェニレン- $\text{C}_{1-6}$  アルキル、フェニレンおよびカルボニル- $\text{C}_{1-20}$  アルキルからなる群

より選ばれる連結基を示し、

n は 5 ～ 20,000 の整数であり、

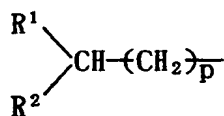
m は 5 ～ 10,000 の整数であり、そして

x の単位と y の単位の割合は 20 : 1 ～ 1 : 2 である、

で表されるブロック共重合体。

【請求項 6】 一般式 (I) における A I が水素原子あるいは式

【化 4】



(上記式中、

(i) p は 0 ～ 10 の整数であって、かつ  $R^1$  および  $R^2$  は、独立して、水素原子、 $C_{1-10}$  アルコキシ、アリアルオキシもしくはアリアル- $C_{1-3}$  アルキルオキシ基を示すか、または、

$R^1$  および  $R^2$  は、一緒になって、 $C_{1-6}$  アルキルで置換されていてもよいエチレンジオキシ ( $-O-CH(R')-CH-O-$  : ここで  $R'$  は水素原子または  $C_{1-6}$  アルキルである) もしくはオキシ ( $=O$ ) 基を示すか、または

(ii) p は 0 または 1 であって、かつ  $R^1$  および  $R^2$  は、一緒になって単糖もしくはその誘導体の残基を構成する原子団を示す、

の基である請求項 5 記載の共重合体。

【請求項 7】 一般式 (I) における L がカルボニル- $C_{2-6}$  アルキルである請求項 5 または 6 記載の共重合体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、コア-シェル構造を持つポリオンコンプレックスミセルの安定化方法および安定化された該ミセル、ならびに該ミセルの調製に使用できる特定のブロック共重合体に関する。該コア-シェル構造は、そのコア部がブロック共重合体の荷電性セグメントと高分子電解質のポリオンコンプレックスからなり、

そしてシェル部がブロック共重合体の親水性セグメントからなる。

【0002】

【従来の技術】

カチオン性のブロック共重合体であるポリ（エチレングリコール）-ブロック-ポリ（L-リシン）〔以下、PEG-P(Lys) という場合あり〕と、天然もしくは合成アニオン性単独重合体は、両者の間に働く静電的相互作用によって水中で自律的に会合し、球形のミセルを形成する。このミセルは粒径が数十ナノメートルで、内核のポリイオンコンプレックスをPEG外殻が覆ったコア-シェル構造を持っており、ポリイオンコンプレックスミセル（PICミセル）と呼ばれている（Harada and Kataoka, *Macromolecules*, 1995, 28, 5294-5299; Kataoka et al., *Macromolecules*, 1996, 29, 8556-8557; Harada et al., *Macromolecules*, 1998, 31, 288-294; Kabanov et al., *Macromolecules*, 1996, 29, 6797-6802）。

【0003】

これらのPICミセルは、内核に種々のアニオン性高分子を保持することができる上、数十ナノメートルという粒径とコア-シェル構造により生体の異物認識機構を回避することが期待できるため、アンチセンスDNAや遺伝子治療のためのプラスミドDNAの運搬体として利用することが考えられている。一般的にこれらのPICミセルは、生理的条件下で相当安定であるが、実際の使用に際しては、静脈注射による投与後の希釈によってPICミセルが解離してしまうことや、血清タンパク質との相互作用すること、生理条件下での安定性が十分でない場合も存在する。このため、確実に目的部位へ到達するまで解離せず安定に存在するように、PICミセルの性質を改変する必要がある。PICミセルを安定化する目的で、共有結合による内核（コア）や外殻（シェル）を架橋することが提案されている（Guo et al., *Macromolecules*, 1996, 29, 2487-2493; Thurmond et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, 7239-7240）。しかし、期待する薬効を得るためには、目的の細胞内の環境に応答して架橋が開裂し、PICミセルが解離することにより、内包されたDNAを放出しなければならない。

## 【0004】

## 【発明が解決しようとする課題】

したがって、本発明の目的は、殊に、PICミセルが少なくとも動物の細胞内に送達されるまでは安定であるが、細胞内ではPICミセルが容易に解離されるようなPICミセルの安定化手段を提供するにある。

## 【0005】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、従来の共有結合による架橋に代え、ジスルフィド（-S-S-）結合を介する架橋を利用すると、細胞外では安定に保持できるが、細胞内ではPICミセルが容易に解離しうることを見出した。理論により拘束されるものでないが、このような作用・効果は、動物細胞の内部が、一般的に、血流中と比較してより強い還元的環境であることから（例えば、Huang et al., Bioconjugate Chem. 1998, 9, 612-617参照）、ジスルフィド結合が細胞内ではチオールに還元され開裂することに起因するものと考えられる。

## 【0006】

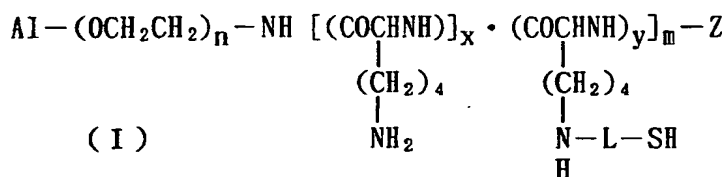
したがって、本発明は、親水性セグメントおよび荷電性セグメントを含むブロック共重合体と高分子電解質とから形成されるコア-シェル構造のポリイオンコンプレックスミセルの安定化方法であって、コア部を形成するブロック共重合体の荷電性セグメントに少なくとも1個のチオール残基を担持させ、該荷電性セグメント間でそれらに担持させたチオール残基を介するジスルフィド結合の架橋を形成させることを特徴とする前記安定化方法、に関する。

## 【0007】

また本発明は、かような安定化方法によって調製することのできる、例えば、一般式（I）

## 【0008】

【化5】



【0009】

式中、AIは水素原子またはアニオン重合開始剤の有機残基を示し、

Zは水素原子または式-L-SHの残基を示し、

LはC<sub>1-20</sub>アルキレン、C<sub>1-6</sub>アルキル-フェニル、C<sub>1-6</sub>アルキル-フェニレン-C<sub>1-6</sub>アルキル、フェニレンおよびカルボニル-C<sub>1-20</sub>アルキルからなる群より選ばれる連結基を示し、

nは5～20,000、(好ましくは50～20,000)の整数であり、

mは5～10,000の整数であり、そして

xの単位とyの単位の割合は20:1～1:2である、

で表されるブロック共重合体と高分子電解質とから形成されたコア-シェル構造のポリイオンコンプレックスミセルであって、水性媒質中でコア部を形成する該ブロック共重合体のポリアミンセグメント(式(I)でmの繰り返し単位を持つセグメント)と高分子電解質とがイオン対を形成しており、そして該セグメント内の少なくとも1個メルカプトを介して該共重合体の2分子以上が架橋していることを特徴とするポリイオンコンプレックスミセル組成物に関する。

【0010】

またさらに、本発明は、上記一般式(I)で表されるブロック共重合体にも関する。

【0011】

以下、本発明をより具体的に説明する。

【0012】

本発明のコア-シェル構造のポリイオンコンプレックスミセルの安定化方法は、上述のようなジスルフィド結合を介してミセルが安定化されるものである限り、使用するブロック共重合体および高分子電解質は、それらの種類に制限される

ことなくすべて本発明に包含される。かようなブロック共重合体は、それ自体既知の親水性セグメントと荷電性セグメントからなる共重合体に、必要により、適当な化学的手段でチオール残基を共有結合させたものが使用できる。親水性セグメントは、主として、ポリ（エチレングリコール）からなるものが好ましい。「主として」とは、ポリ（エチレングリコール）が、分子量比で、セグメント中の 80% 以上を占めるものであればよい。他方、荷電性セグメントは、いずれかの pH、好ましくは、pH 3.0～8.5 の水性媒質（または水溶液）中で、カチオンまたはアニオンのいずれかに荷電しうる基を繰り返し単位中に少なくとも 1 個含むセグメントを意味する。カチオンに荷電しうる基としては、アミノ基またはイミノ基、さらには第四級アミノ基を挙げることができ、これらの基は、高分子側鎖に存在するか、さらにイミノ基もしくは第四級アミノ基にあっては高分子主鎖に存在していてもよい。アニオンに荷電しうる基としてはカルボキシル基もしくはスルホ基または硫酸基を挙げることができ、これらの基は、それらの基を高分子側鎖とする繰り返し単位を有するそれ自体既知の重合体を利用して、あるいはそのような重合体の製造方法を利用して、ブロック共重合体中に組み込むことができる。

## 【0013】

本発明に従えば、これらの荷電性セグメント（ $\omega$ -末端を含む）には少なくとも 1 個のチオール残基が担持されていることが必要である。ここでチオール残基とは、チオール化合物に由来する残基を意味し、これらの残基は例えば、上記アミノまたはイミノ基に保護されていてもよいメルカプト基含有アルキル化剤またはアシル化剤を用い、あるいはカルボキシル基の場合には、カルボキシル基に保護されていてもよいメルカプト基含有アミンまたはアルコールを用い、常法により導入することができる。

## 【0014】

限定されるものでないが、親水性セグメントがポリ（エチレングリコール）であり、荷電性セグメントの荷電しうる基がアミノ基またはイミノ基であるブロック共重合体としては、上記、Kataoka（片岡）et al. に記載された PEG-P（Lys）や、Kabanov et al., Bioconj. Chem. 1995, 6, 639 に記載さ

れたポリ（エチレングリコール）-ポリスぺルミン共重合体や、また、本願と同時に係属する特願平 1 1 - 2 2 1 0 2 6 号明細書に記載されるオキサゾリン由来のポリアミン単位を有するブロック共重合体が挙げられる。これらの共重合体の荷電性セグメントへのチオール残基の導入は、例えば、詳細には後述する、活性エステル型の N-スクシンイミジル 3-（2-ピリジルジチオ）プロピオネートやこれらの類似物を用いて、アミノ基またはイミノ基をアシル化し、次いで、ピリジルチオ基を還元開裂することにより実施することができる。

【0015】

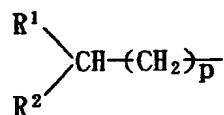
したがって、本発明の好ましい態様としては、上記一般式（I）で表されるブロック共重合体を用いる安定化された P I C ミセルが提供される。一般式（I）で表されるブロック共重合体はそれ自体新規化合物である。

【0016】

一般式（I）で表されるブロック共重合体における A I を規定するアニオン重合開始剤に有する有機残基は具体的には、式

【0017】

【化 6】



【0018】

（上記式中、

（i） p は 0 ~ 10 の整数であって、かつ R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、独立して、水素原子、C<sub>1-10</sub> アルコキシ、アリーロキシもしくはアリール-C<sub>1-3</sub> アルキルオキシ基を示すか、または、

R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、一緒になって、C<sub>1-6</sub> アルキルで置換されていてもよいエチレンジオキシ（-O-CH(R')-CH-O-：ここで R' は水素原子または C<sub>1-6</sub> アルキルである）もしくはオキシ（=O）基を示すか、または

（ii） p は 0 または 1 であって、かつ R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、一緒になって単糖もしくはその誘導体の残基を構成する原子団を示す、

の基である。

【0 0 1 9】

このような

【0 0 2 0】

【化 7】

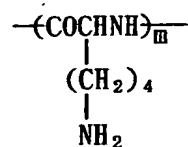


【0 0 2 1】

セグメントを形成する方法は、例えば、上述の Kataoka et al., や、WO 9 6 / 3 2 4 3 4、WO 9 6 / 3 3 2 3 3、WO 9 7 / 0 6 2 0 2 等に具体的に記載されている。これらの記載は、引用することによって本明細書に組み込まれる。また、かような親水性セグメントに、荷電性セグメント、例えば、

【0 0 2 2】

【化 8】



【0 0 2 3】

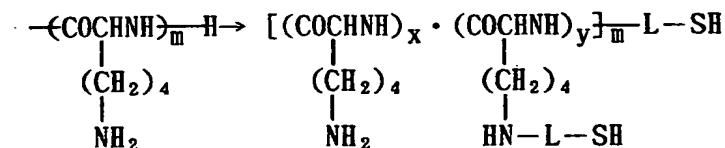
を導入する方法は上述の Kataoka et al. や、そこで引用されている文献に詳細に記載されている方法に従えばよい。

【0 0 2 4】

本発明によれば、荷電性セグメントにチオール残基が例えば下記反応スキームに従って、共有結合的に導入される。

【0 0 2 5】

【化 9】



【0 0 2 6】

(上式中、Lは $C_{1-20}$ アルキレン、 $C_{1-6}$ アルキル-フェニル、 $C_{1-6}$ アルキル-フェニレン- $C_{1-6}$ アルキル、フェニレンおよびカルボニル- $C_{1-20}$ アルキルからなる群より選ばれる連結基であり、好ましくはカルボニル- $C_{2-6}$ アルキルであり、そして

xの単位とyの単位の最適な割合は、m値によっても変動しうるので限定されないが、通常、20:1~1:2の範囲内にある。また、xの単位とyの単位は、それぞれブロックを形成してもよいが、好ましくはランダムに配列される。)

上記の反応スキームは、それ自体既知の反応、例えば、対応するモノ-ハロゲン化チオールを用いるアルキル化、対応する活性エステルを用いるアシル化によって実施できる。

#### 【0027】

こうして、製造された、チオール残基を担持するブロック共重合体は新規化合物であり、本発明の一態様である。

#### 【0028】

本発明に従うPICミセルの調製は、上記 Harada and Kataoka や Kataoka et al., に記載のそれ自体既知の方法により、親水性セグメントおよび荷電性セグメントとを含み、さらに電荷性セグメント中に少なくとも1個のチオール残基を担持させたブロック共重合体と高分子電解質とを水性媒質中で処理することにより行うことができる。処理法の具体例については、後述の実施例で説明するので参照することができる。

#### 【0029】

本発明のPICミセル中に内包される高分子電解質は、荷電性セグメントに応じてそれぞれ選ぶことができるが、一般的に、水性媒質（または水）中でイオン解離する基を有するポリマーを意味する。しかし、本明細書では、所謂、オリゴマーと称される範疇に入るものも「ポリ」の接頭辞を付していることに注意されたい。したがって、高分子電解質として、ポリペプチド、オリゴペプチド、プソイドペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチドを挙げることができ、これらの直鎖状または環状であってもよい。ペプチド類には、それ自体既知の各種生理活性ペプチド、生理活性プソイドペプチド、などが包含され、ポリヌクレオ

チドには、DNA断片、RNA断片、アンチセンスDNA、環状DNA、などが包含される。これらのペプチド類またはポリヌクレオチド類は、通常、pHによって、カチオンまたはアニオンに荷電しうる場合があるので、PICミセル調製条件を選ぶことにより、荷電性基がカチオンを生じるかまたはアニオンを生じるかのいずれのブロック共重合体と共に使用することもできる。しかし、ポリヌクレオチド類を用いる場合には、カチオンを生じるブロック共重合体、特に、一般式(I)で表されるブロック共重合体を用いてPICミセルを調製することが好ましい。

#### 【0030】

本発明に従えば、PICミセルが形成された後、ブロック共重合体の荷電性セグメントに担持させたチオール残基を介するジスルフィド結合による架橋が形成されることに特徴がある。かようなジスルフィド結合は、PICミセル含有水性媒質を酸化条件下に置くことにより形成できる。通常、酸化条件は周囲環境下への放置ないしは空気酸化される条件下に置くのがよい。本発明に関していう水性媒質とは、一般に、水、適当な緩衝剤また、場合によって電解質、さらには水混和性の有機溶媒をも含む水溶液を意味する。

#### 【0031】

本発明に従う安定化されたPICミセルは電解質がかなり含まれる水性媒質中でも安定に存在することができるが、還元条件下の、特に一定濃度の電解質を含む水性媒質中では解離しうる。

#### 【0032】

したがって本発明によれば、特に高分子電解質を生体内に運搬または送達するために適する手段が提供できる。

#### 【0033】

#### 【実施例】

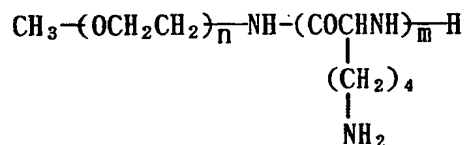
以下、具体例を挙げて本発明をさらに説明するが、これらは本発明の理解を容易にするためのものであり、本発明をこれらに限定することを意図するものではない。

製造例：チオール残基が導入されたPEG-P(Lys)の製造

(1) PEG-P(Lys) の製造

【0034】

【化10】



【0035】

上述の Kataoka et al. に記載の方法に従って得られた $\alpha$ -メトキシ- $\omega$ -アミノポリ(エチレングリコール) (PEG、 $M_w=5000$ ) を開始剤として用い、 $\epsilon$ -ベンジルオキシカルボニル-L-リシンのN-カルボン酸無水物 (NCA) を開環重合することによってポリ(エチレングリコール)-ブロッカーポリ( $\epsilon$ -ベンジルオキシカルボニル-L-リシン) (PEG-P(Lys(Z))) を製造した。こうして得られたPEG-P(Lys(Z)) のベンジルオキシカルボニル基 (Z基) を30% HBr / AcOHで脱保護してPEG-P(Lys) を得た。

【0036】

他方、高分子電解質のモデル化合物としてのポリ(L-アスパラギン酸) (P(Asp)) は、 $\beta$ -ベンジル-L-アスパルテートのNCAの開環重合により重合したポリ( $\beta$ -ベンジル-L-アスパルテート) (開始剤n-ブチルアミン) をアルカリ脱保護して得た。

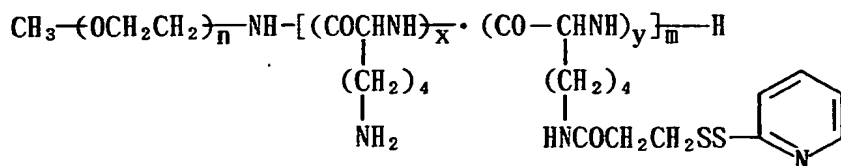
【0037】

PEG-P(Lys) のポリリシンセグメントおよびP(Asp) の重合度は、 $^1\text{H-NMR}$ 測定から、それぞれ22と15と求められた。

(2) PEG-P(Lys) へのチオール残基の導入

【0038】

【化 11】



【0039】

PEG-P(Lys) へのピリジルジチオプロピオニル基PDP基)の導入を行った。この導入は、N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)を用いて行った。PEG-P(Lys)は臭素酸塩のものを0.1N、pH6.5の酢酸緩衝液に溶解させ、同緩衝液に対して透析し、対イオンを酢酸イオンに交換して用いた。PEG-P(Lys)酢酸塩(200mg)とSPDP(56mg、リジン残基に対して0.5モル当量)を5mlのN-メチルピロリドン(NMP、5wt%の塩化リチウムを添加し脱気したもの)に溶解させた。この溶液に0.5mlのN.N.ジイソプロピルエチルアミンを、アミンを脱プロトン化するために添加し、反応を開始した。反応液は、室温で1時間攪拌し、反応の追跡は逆相クロマトグラフィーによって行った。

【0040】

反応の終了後、反応液をPEGの貧溶媒であるエーテルに滴下し再沈した。粗生成物をメタノールに溶解させた後、エーテルに再沈する操作を繰り返し、水に不要な不純物を取り除いた。過剰の塩は、生成物を0.1Nの酢酸水溶液に溶解させ、蒸留水に対して1時間透析することによって取り除いた。最終精製物は、凍結乾燥し回収した。収量は150mgであった(ポリマーのモル数から計算した収量は69%)。

【0041】

得られたポリマーの構造は $^1\text{H}$ -NMR測定によって確認した(スペクトラムは図1参照)。PDP基の置換度は、 $^1\text{H}$ -NMR測定とUV測定によって決定した。 $^1\text{H}$ -NMR測定では $\text{D}_2\text{O}$ を溶媒として用い、PDP基のピリジル基のプロトン( $\text{C}_3\text{H}_4\text{N}$ : 7.6ppm)とPEGのメチレン基のプロトン( $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ : 3.5ppm)のピークの強度比から、置換度は6.8と求められた。UV

測定では、PDP基をジチオスレイトール（DTT）によって還元したときに遊離する2-チオピリドンの吸光度（ $\lambda_{\text{max}} = 343 \text{ nm}$ ,  $\epsilon = 7.06 \times 10^3$ ）から、置換度6.7と計算された。異なる二つの方法で求められた置換度は良く一致しており、リジンのアミノ基の約30%にPDP基が導入されたことが示された。

#### 製造例2：ジスルフィド（SS）結合で内核を架橋したPICミセルの調製

内核をSS結合で架橋したPICミセルの調製は以下の方法で行った。まず、上記の方法でPDP基を導入したPEG-P(Lys)（PEG-P(Lys)-PDP）を、10mMリン酸緩衝液（pH7.4）に溶解させた後、0.1- $\mu\text{m}$ のフィルターで濾過しゴミを除いた。次に、DTTをPDP基に対して3倍の濃度となるように加えて15分間攪拌し、PDP基をチオール残基に還元した。この溶液にP(Asp)をPEG-P(Lys)-PDPの正電荷とP(Asp)の負電荷の比が1となるように添加しPICミセルを形成させた。ここで、PEG-P(Lys)-PDPのアミノ基とP(Asp)のカルボキシル基は、PEG-P(Lys)とP(Asp)の測定結果に基づいて、全てイオン化していると仮定した。

#### 【0042】

両ポリマーを混合し、2時間静置したあと、分画分子量6000-8000の透析膜を用いて、1Lの10mMリン酸緩衝液（pH7.4）に対して透析し、DTTや2-チオピリドンを除いた。透析は3日間続け、この間、空気中の酸素によって、チオールをSS結合に酸化し架橋させた。3日間の透析後、未酸化のチオールが存在しないことは、Ellman法によって確認した。PICミセルの溶液は、透明で沈殿は認められなかった。

#### 特性試験：光散乱法による架橋ミセルの特性解析

架橋したPICミセルの構造は、動的光散乱測定法（DLS）によって評価した。ミセル溶液に対してDLS測定を行い、ヒストグラム法によってデータを解析して得られた結果から、架橋したPICミセルの粒径の分布は単峰性であり、分布の程度もかなり小さいことが示された（ $d_w/d_n = 1.10$ ）（図2参照）。拡散係数の測定角度依存性はなく、ミセルが球形であることも示唆された。

また、測定範囲内（高分子濃度  $0.5 - 4.0 \text{ mg/ml}$ ）で拡散係数の濃度依存性はなく、二次的な凝集は認められなかった。無限希釈に外挿しもとめた拡散係数の値から、Stokes-Einstein の式を用いて、ミセルの流体力学的半径は  $16.1 \text{ nm}$  と計算された。キュムラント法によって求められた多分散度は  $0.08$  であり、天然のウィルスにも匹敵する値となった。

## 【0043】

また、透析前、チオールを S S 結合に酸化する前のミセルの粒径は  $15.7 \text{ nm}$  であった。透析前後 P I C ミセルの粒径がほぼ同程度であるという結果は、S S 結合の形成がミセルの構造に大きな影響を与えていないことを示唆している。少なくとも 2 週間、P I C ミセルの粒径に目立った変化はなかった。これは、P I C ミセルの内核が親水性の P E G 層によって覆われており、それらの立体反発のため、コロイド粒子としての高い安定性を持っているためであると考えられる。

## 【0044】

S S 架橋の P I C ミセルの安定性に対する影響は、種々の N a C l 濃度に対するミセルの見かけの分子量を静的光散乱法によって測定し評価した（図 3 参照）。チオールを導入しておらず架橋されていない P I C ミセルの場合は、N a C l 濃度の増加とともに見かけの分子量は急激に減少する挙動がみられ、ミセルが解離した。一方、架橋ミセルの見かけの分子量の減少は、N a C l 濃度  $0.5 \text{ M}$  においても非常に小さかった。また、D L S から求めたキュムラント粒径は、評価した N a C l の濃度の範囲内で  $32.0 \text{ nm}$  から  $35.2 \text{ nm}$  であり、ミセルが N a C l 濃度に対して著しく安定化していることが確認できた。

## 【0045】

P I C ミセルの安定化が、S S 結合の架橋の形成によるものであることを確認するために、還元剤を添加し散乱光強度の変化を追った（図 4 参照）。安定化が S S 結合のために起こっているならば、高塩濃度下で、S S 結合を選択的に開裂させる還元試薬である D T T を添加すると P I C ミセルの解離が起こるはずである。実際に、D T T 添加後の測定角度  $90^\circ$  の散乱光強度を追跡した結果、散乱光強度の急激な減少が見られた。この減少は、ミセルの解離に対応していると考え

えられ、安定化が S S 結合の形成によることが確認された。また、解離速度は D T T の添加濃度依存的であり、2 mM では、50 分程度でミセルは完全に解離した。また、この P I C ミセルの解離と同調して、内包された P (A s p) は、溶液中に放出されると考えられる。

#### 【0046】

動物細胞中に最も大量に存在する S S 結合の還元剤は、グルタチオンという低分子チオールであり、その濃度は細胞内では 3 mM 程度であるのに対し、血流中では、その 300 分の 1 の 10  $\mu$ M のオーダーであることが知られている。このように、細胞内と細胞外で濃度が大きく異なり、S S 結合の解離速度は還元剤の濃度に依存することから、S S 結合で安定化した P I C ミセルを、DNA を含む生理活性をもつ高分子電解質、例えばポリアニオンの、細胞内への運搬体として利用することが可能であると考えられる。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図 1】

製造例 1 で得られたチオール残基の導入された P E G - P (L y s) の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトラムである。

##### 【図 2】

製造例 2 で調製されたチオール化した P E G - P (L y s) と P (A s p) から形成させたポリイオンコンプレックスミセルの z - 平均粒径分布を示すグラフである。透析 3 日後、測定角度 90° ; 温度 25℃ ; ブロック共重合体濃度 2 mg / ml ; 溶媒 10 mM P B S (p H 7.4) の条件に従う。

##### 【図 3】

架橋ミセル (黒丸) および架橋をしていないミセル (白抜き丸) の N a C l 濃度に対する見かけの分子量の変化を示すグラフである。ブロック共重合体濃度 1 mg / ml ; 濃度 25℃ ; 溶媒 10 mM P B S (p H 7.4) の条件に従う。

##### 【図 4】

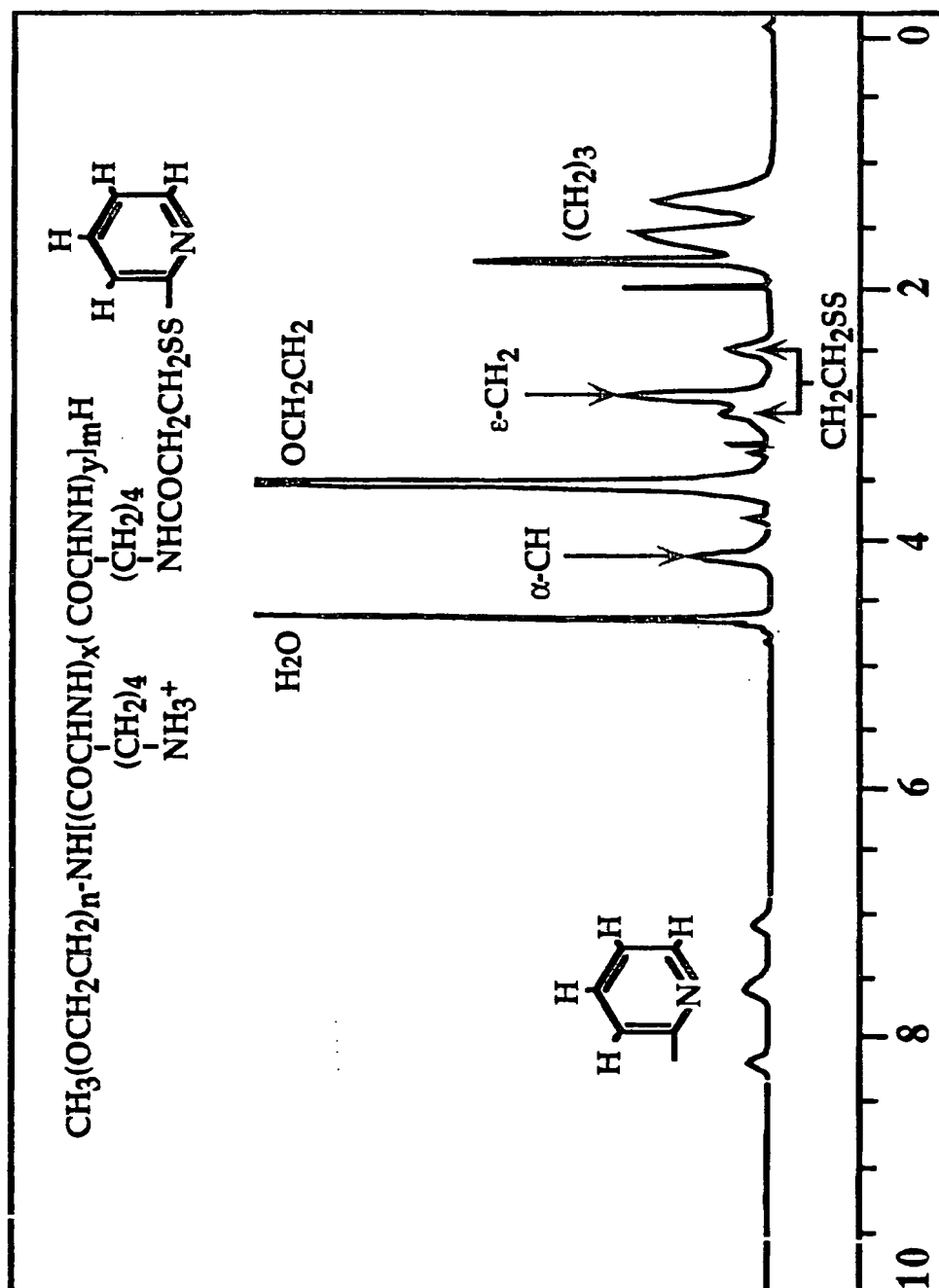
本発明に従う P I C ミセル溶液へジチオスレイトール (D T T) 添加した後の散乱光強度の変化を示すグラフである。D T T 添加濃度 : 0.5 mM (丸) 、 1.0 mM (四角) 、 2.0 mM (三角) ; ブロック共重合体濃度 1.0 mg / ml ;

特平 11-3300

NaCl 濃度 0.3 M ; 濃度 25℃ ; 溶媒 10 mM PBS (pH 7.4) の条件  
に行う。

【書類名】 図面

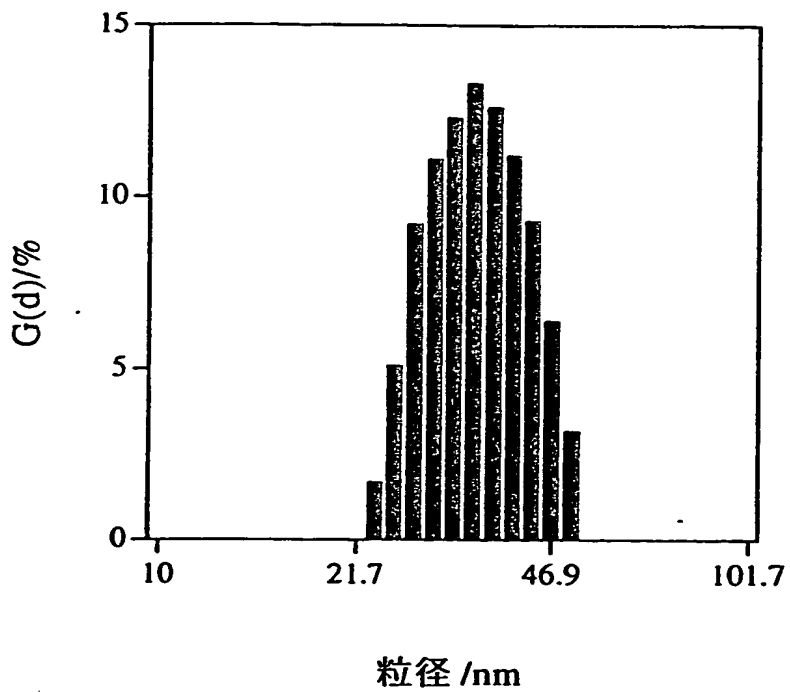
【図 1】



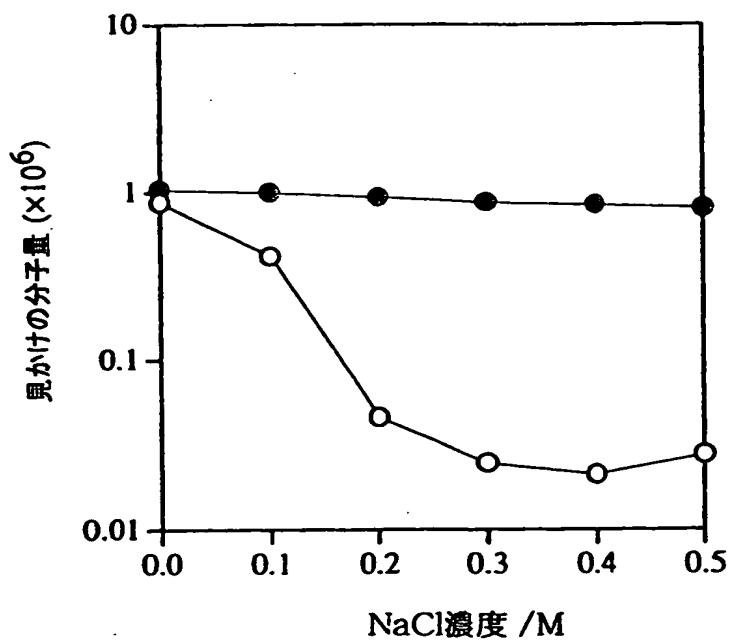
$\text{D}_2\text{O}/25^\circ\text{C}$

ケミカルシフト (ppm)

【図 2】



【図 3】



【図 4】

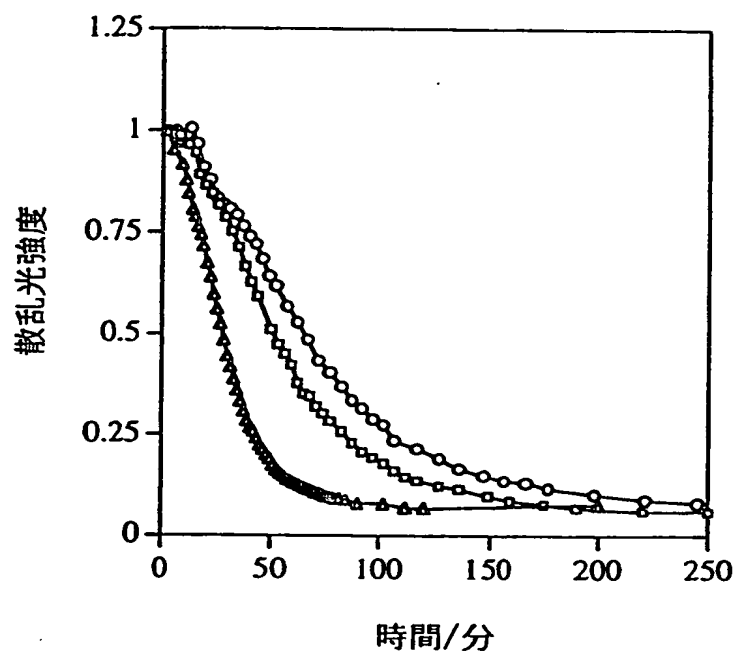


図 3.DTT添加後の散乱光強度の変化  
 ([DTT], 0.5mM (○), 1.0 mM (□), 2.0 mM (△); 高分子濃度, 1.0 mg/ml;  
 [NaCl], 0.3 M; 温度 25 °C; 溶媒 10 mM PBS (pH 7.4))

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 高分子電解質の運搬体として利用できるポリイオンコンプレックスミセルの安定化法の提供に関する。

【解決手段】 親水性セグメントおよび荷電性セグメントとを含むブロック共重合体と高分子電解質とから形成されるコア-シェル構造のポリイオンコンプレックスミセルの安定化方法であって、コア部を形成する荷電性セグメントに少なくとも 1 個のチオール残基を担持させ、該荷電性セグメント間でそれらに担持させたチオール残基を介するジスルフィド結合の架橋安定を形成させることによる前記ミセルの安定化方法。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第330065号
受付番号	59901135012
書類名	特許願
担当官	第六担当上席 0095
作成日	平成12年 2月17日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	597144679
【住所又は居所】	東京都世田谷区用賀4-5-16
【氏名又は名称】	ナノキャリア株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】	100060782
【住所又は居所】	東京都港区赤坂1-9-15 日本自転車会館内
【氏名又は名称】	小田島 平吉

【選任した代理人】

【識別番号】	100094293
【住所又は居所】	東京都港区赤坂1丁目9番15号 日本自転車会館 小田島特許事務所
【氏名又は名称】	藤井 幸喜

【選任した代理人】

【識別番号】	100103311
【住所又は居所】	東京都港区赤坂1丁目9番15号 日本自転車会館
【氏名又は名称】	小田嶋 平吾

特平 1 1 - 3 3 0 0 6 5

【書類名】 新規性の喪失の例外証明書提出書

【提出日】 平成 11 年 12 月 1 日

【あて先】 特許庁長官 近藤 隆彦 殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成 11 年特許願第 330065 号

【提出者】

【識別番号】 597144679

【氏名又は名称】 ナノキャリア株式会社

【代理人】

【識別番号】 100060782

【弁理士】

【氏名又は名称】 小田島 平吉

【電話番号】 03-3585-2256

【提出物件の目録】

【物件名】 発明の新規性の喪失の例外の規定の適用を受けるための  
証明書 2

【書類名】 新規性の喪失の例外証明書提出書

【提出日】 平成 11 年 12 月 1 日

【あて先】 特許庁長官 近藤 隆彦 殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成 11 年特許願第 330065 号

【提出者】

【識別番号】 597144679

【氏名又は名称】 ナノキャリア株式会社

【代理人】

【識別番号】 100060782

【弁理士】

【氏名又は名称】 小田島 平吉

【電話番号】 03 - 3585 - 2256

【提出物件の目録】

【物件名】 発明の新規性の喪失の例外の規定の適用を受けるための  
証明書 2

特平 11-330065

# 高分子学会予稿集

19922500116



第48回(1999年)

高分子討論会

10月5日~8日

新潟大学五十嵐キャンパス

## 48 12

生体高分子、高分子における分子シンクロナイゼーション、  
超分子構造の精密構築と機能の発現、結晶高分子

Polymer Preprints, Japan  
Vol.48 No.12



高分子学会 THE SOCIETY OF POLYMER SCIENCE, JAPAN

# IIPe085 Antisense DNA 内包ポリイオンコンプレックスミセルの構築 -SS 結合による内核安定化効果-

東大院工 ○柿澤資訓・原田敦史・片岡一則

## 【緒言】

我々は、これまでに antisenseDNA と poly(ethyleneglycol)(PEG)と poly(L-lysine) (PLL) のブロック共重合体 (PEG-PLL) から形成された高分子ミセルを薬物運搬体としての利用することを検討してきた(1)。この高分子ミセルは、polyanion である antisenseDNA と polycation である PLL の間に働く静電引力によって形成され、ポリイオンコンプレックスミセルと呼ばれている。高分子ミセルを薬物運搬体として用いる利点として、水溶性で生体適合性の高い PEG 鎖の外殻が antisenseDNA を保持している内核を覆っているため、酵素による分解を回避することや、その特異的なサイズにより生体の排除機構を逃れるステルス性を持つことが期待できる。一方、高分子ミセルは希釈や塩濃度に対する安定性に問題があり、血流中では血清タンパク質との相互作用も考えられるため、ミセルの安定化が必要である。さらに、薬効発現のためには標的部位で内包された薬品を効率的に放出しなければならない。そこで、本研究では、これらの必要とされる性質を高分子ミセルに付与するため、PEG-PLL の lysine block に thiol 基を導入し、高分子ミセルの内核を SS 結合で架橋することを試みた。SS 結合は血流中では安定であり、還元的な環境である細胞内で開裂することが期待される。この性質により、高分子ミセルは血中で安定に存在し、標的の細胞内では解離し、内包された薬物を放出することが期待できる。本発表では、SH 基を導入した PEG-PLL の合成と、核酸のモデル高分子として使用した poly(aspartic acid) (P(Asp)) を内包した高分子ミセルの調製と特性解析について報告する。

## 【実験】

### PEG-PLL の lysine 側鎖への thiol 基の導入

PEG-PLL への thiol 基の導入は、ヘテロ二官能性試薬 N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP) を用いて行った。PEG-PLL は PEG 分子量 5,000、poly(lysine) の重合度 22 のものを、透析により対イオンを臭素イオンから酢酸イオンに交換して用いた。5wt% の LiCl を加えた N-methylpyrrolidone に溶解させた PEG-PLL、SPDP 溶液を混合し、アミノ基を脱プロトン化するために三級アミン(DIEA)を添加した後、室温で攪拌し反応させた。反応の追跡は逆相クロマトグラフィー(RPLC)で行った。生成物は、MeOH/Ether 再沈を繰り返した後、水に対して透析し精製した。合成後、<sup>1</sup>H-NMR 測定および UV 測定によって、精製及び構造の確認、導入率の決定をした。

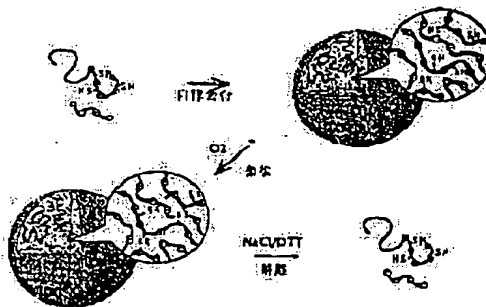


図 1. ミセル内核の SS 架橋

Structural design of polyanion complex micelles entrapping antisense DNA: Stabilization by cross-linking of the core through disulfide bond

Yoshinori Kakizawa, Akiuchi Harada, Kazunori Katoaka

(Department of Materials Science, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan) Tel: 03-5841-7145 FAX: 03-5841-7139 e-mail: kakizawa@bmv.mmm.tu-tokyo.ac.jp

### PEG-PLL-thiol との PIC micelle 形成および特性解析

PEG-PLL-PDP を還元剤 DTT によって thiol 化した後、poly(aspartatic acid)(重合度 15)溶液を、電荷の比が 1 となるように添加し、高分子ミセルを形成させた。その後、緩衝液に対して数日間透析することにより、不純物の除去および空気中の酸素による架橋反応を行った。形成されたミセルの構造および特性の解析は、静的および動的光散乱法によって行った。架橋によるミセルの安定化は、NaCl 濃度に対する安定性を静的光散乱法により見かけの分子量を求めることによって評価した。

#### 【結果及び考察】

#### PEG-PLL の lysine 側鎖への thiol の導入

RPLC 及び  $^1\text{H-NMR}$  測定の結果から、PEG-PLL の lysine 側鎖への PDP 基の導入が確認された。収率は約 69%であり、UV スペクトルと NMR スペクトルから決定した導入量は、それぞれ、高分子鎖一本当たり 6.7 および 6.8 となり、lysine 残基に対する導入率は約 30%であった。また、未反応のアミノ基は約 16 であった。

#### PEG-PLL-thiol と P(Asp) の PIC micelle 形成および特性解析

Lysine block への thiol 基の導入後も、PEG-PLL と P(Asp) は pH 7.4 の緩衝溶液中でミセルを形成することが光散乱測定によって確かめられた。ミセル溶液に対して動的光散乱測定(DLS)を行い、ヒストグラム法により解析をした結果、ミセルの粒径分布は比較的狭く、ユニモーダルであることが示された(図 2)。同じく DLS の結果をキュムラント法により解析したところ、多分散度は 0.08、ミセルの流体力学的半径は 16 nm と求められた。また、ミセル粒径の測定角度依存性はなく、ミセルが球形であることが示唆された。内核架橋によるミセルの安定性は、NaCl 濃度に対するミセルの見かけの分子量の変化を静的光散乱法で測定することにより評価した(図 3)。thiol 基を導入していない PEG-PLL からなる高分子ミセルは、NaCl 濃度の増加にともないポリマー間の静電相互作用が遮蔽されるため、分子量の急激な減少がみられ、NaCl 濃度が 0.3M においてほぼ解離した状態であると考えられる。それに対し、架橋したミセルでは NaCl 濃度に対する見かけの分子量の変化は小さく、ミセルの安定化が起こっていることが確認された。また、NaCl 濃度 0.3 M の架橋ミセル溶液に、SS 結合の還元剤である DTT を添加したところ、ミセルの解離する挙動がみられ、安定化が SS 結合の形成によるものであることが明らかとなった。

1) K. Kataoka, H. Tozawa, A. Harada, K. Yasugi, T. Matsumoto, S. Katayose, *Macromolecules*, 1996; 29, 8556

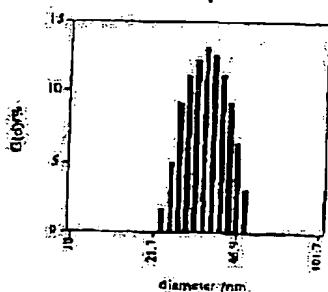


図 2. ミセルの粒径分布

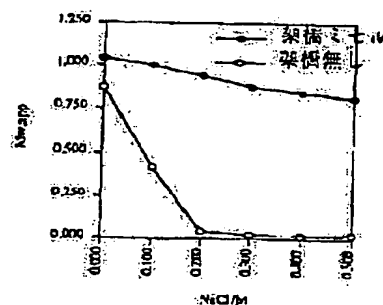


図 3. ミセルの塩濃度に対する安定性

# 第 48 回高分子討論会運営委員会

## 《運営委員長》

及川 栄彦 新潟大学工学部

## 《副運営委員長》

坪川 紀夫 新潟大学工学部

## 《運営委員》

青木 俊樹 新潟大学工学部

飯田 高三 新潟大学工学部

池田 功夫 福井大学工学部

石井 正雄 株式会社 クラレ

五十野晋信 長岡技術科学大学

川上 雄賢 北陸先端科学技術大学院大学

北野 博巳 富山大学工学部

塩見 友雄 長岡技術科学大学

鈴木 秀松 長岡技術科学大学

竹内 茂弥 富山大学教育学部

早川 和久 信越化学工業株式会社

宮内信之助 長岡技術科学大学

宮下 徳治 東北大学反応化学研究所

## 《プログラム委員》

小林 高臣 長岡技術科学大学

竹中 克彦 長岡技術科学大学

## 高分子学会予稿集

48 巻 (1999)

第 12 号—生体高分子、高分子における分子

シンクロナイゼーション、

超分子構造の精密構築と機能の発現、

結晶高分子

(無断で複製・転載を禁じます)

©1999 The Society of Polymer Science, Japan

平成 11 年 9 月 20 日発行

## 第 48 回高分子討論会

会 期—平成 11 年 10 月 6 日～10 月 8 日

会 場—新潟大学 五十嵐キャンパス

発行者—社団法人 高分子学会

〒104-0042

東京都中央区入船 3-10-9

入船 82 番ビル

電話 03-6540-8770

印刷所—株式会社 国際文献印刷社

証 明 願

平成11年11月22日

社団法人 高分子学会  
会長 中浜 精一 殿

申請人氏名 片岡 一則



住 所 千葉県柏市大室1083-4

高分子学会 第48回高分子討論会において下記の通り文書をもって発表したことを  
証明願います。

記

- |            |  |
|------------|--|
| 1. 研究集会の名称 | 高分子学会  |
| 2. 主催      | 社団法人 高分子学会   |
| 3. 期日      | 平成11年10月7日   |
| 4. 会場      | 新潟大学五十嵐キャンパス   |
| 5. 研究発表課題  | Antisense DNA 内包ポリイオンコンプレックスミセルの構築 — S-S結合による内核安定化効果 — |
| 6. 研究者名    | 柿沢賢訓・原田敦史・片岡一則   |
| 7. 文書の種類   | 高分子学会 予稿集 48巻12号<br>ページ(別添) 2989~2990                  |

上記の通り証明します。

平成11年11月24日

社団法人 高分子学会  
会長 中浜 精一



---

# 高分子学会予稿集

---

第48回(1999年)

高分子討論会

10月6日～8日

新潟大学五十嵐キャンパス

---

**48.12**

巻

号

生体高分子、高分子における分子シンクロナイズーション、  
超分子構造の精密構築と機能の発現、糖鎖高分子

---

---

Polymer Preprints, Japan  
Vol.48 No.12



高分子学会 THE SOCIETY OF POLYMER SCIENCE, JAPAN.

---

- II Pe071 2543 配向表面を有する含フッ素ポリイミド中空糸膜の気体透過選択性—都立大理工 川上 浩良・〇丹羽 基博・長岡 昭二、物質研 金森 敏幸・新保 外志夫
- II Pf072 2545 ミクロ相分離を利用した均質ポリイミド微多孔膜の作成—宇部興産 〇大矢 修生・八尾 滋・永倉 弘一
- II Pe073 2547 ゲル化剤を利用したポリマー溶液の\*その場沈殿\*と多孔質ポリマーの作製—信州大繊維 〇藤原 泰彦・小林 聡・英 謙二・木村 睦・白井 洋芳
- II Pf074 2549 フロー電解重合によるポリマー超格子の作成とその特性—信州大繊維 〇鈴木 雄介・小山 俊樹・谷口 梓原
- II Pe075 2551 電解重合による銅電極上への厚い絶縁性重合皮膜の形成 [II] 官能性残基の架橋による物性向上—松下電器産業 〇阿村 夕佳・川上 哲司
- II Pf076 2553 吸着・乾燥の繰り返しによる高分子超薄膜の創製—鹿児島大 〇序澤 武・橋口 慎二・山元 和哉・土村 聡子・明石 廣
- II Pe077 2555 高分子/無機イオン間の相互作用を利用した炭酸カルシウム薄膜状結晶の作製—東大院工 〇細田 尚也・加藤 隆史
- II Pf078 2557 核酸塩基を有する両親媒性高分子の合成—上智大理工 〇朱 虹・陸川 政弘・関井 浩平
- II Pe079 2559 リビング重合を用いたブロックコポリマーの合成と種々の分子集合体形成—東理大理工 青島 貞夫・〇宮沢 浩史
- II Pf080 2561 光反応時のスピロピラン単分子膜表面の相互作用変化の直接測定—東北大反応研 〇中井 康裕・栗原 和枝
- 生体高分子**
- II Pe081 2981 キトサン・ヨウ素錯体の構造特性に対する分子シミュレーション—東理大理 〇鈴木 喜博・角田 勝則・東理大・フロンティア研 矢島 博文・石井 忠浩、倉敷芸科大 菊地 武司
- II Pf082 2983 温度ジャンプ CD 測定によるジェランの2重らせん形成の速度論的研究—東水大水産 〇黄志広・松川 真吾・渡部 俊子
- II Pe083 2985 酵素触媒重合で形成される人工セルロース球晶の解析—京大院工 〇Lois Jane Hobson、京大木研 杉山 淳司、京大院工 木村 俊作・小林 四郎
- II Pf084 2987 酵素触媒重合による人工キチン球晶の形成と構造解析—京大院工 〇坂本 純二、京大木研 杉山 淳司、京大院工 木村 俊作・小林 四郎
- II Pe085 2989 Antisense DNA 内包ポリイオンコンプレックスミセルの構築—SS 結合による内核安定化効果—東大院工 〇柿澤 賢訓・原田 敦史・片岡 一則
- II Pf086 2991 溶液相におけるタバコモサイクヒールズ RNA の局所構造—名大院工 〇室賀 嘉夫、食総研 佐野 洋、日太短大 田川 浩行、京大化研 終 弓核
- II Pe087 2993 DNA 複製の熱力学的研究 [II] トリプトファン残基による核酸構造および残基成分の認識—大工大 〇稲垣 隆一・馬場 義博・影本 彰弘
- II Pf088 2995 特殊環境下で触媒作用を示すリボザイムの進化分子工学による創成—奈良先端大 〇宮本 義孝、京大院工 寺本 直純、苑島大工 伊藤 嘉浩、奈良先端大 今西 幸男
- II Pe089 2997 Competition between Helix-Coil transition and Folding Transition in Giant DNA—Graduate School of Human Informatics, Nagoya Univ, 〇Sergey V. Mikhailenko・Vladimir G. Sergeyev・Kenichi Yoshikawa
- II Pf090 2999 相補的水素結合による多次元分子組織体の構築を目標とした多官能オリゴ DNA コンジュゲートの合成—関西大工 〇小嶋 真一・関田 和昌・大矢 裕一・大内 辰郎
- II Pe091 3001 ヒト血清トランスフェリンレセプターの分子認識機構に関する分子シミュレーション—東理大 〇坂尻 徹也・角田 勝則、倉敷芸科大 菊地 武司、東理大・フロンティア研 矢島 博文・石井 忠浩
- II Pf092 3003 核酸塩基を用いた分子認識能を有する単分子膜の構築—東北大反応研 〇宮原 隆・栗原 和枝
- II Pe093 3005 シクロデキストリン自己組織化単分子膜による分子認識—富山大工 〇平 佳子・福田 晃生・北野 博巳
- II Pf094 3007 両親媒性 $\alpha$ -ヘリックス分子の2次元配列制御—名工大工 〇横井 秀典・木下 隆利・辻田 義治・吉水 広明
- II Pe095 3009 ポリペプチド単分子膜の物質輸送特性—名工大工 〇毛利 安宏・名工大工・CREST 木下 隆利・辻田 義治、名工大工・CREST 吉水 広明
- II Pf096 3011 配位子を内包するペプチドミセルの調製—名工大工 〇近藤 雅敏、名工大工・CREST 木下 隆利・辻田 義治、名工大工・CREST 吉水 広明
- II Pe097 3013 末端に4級アンモニウム基を持つカチオン性自己集合単分子膜を用いたナノ粒子の集積—九大理工 〇尾上 慎弥・米澤 徹・国武 尊章
- II Pf098 3015 2価イオンによって誘起されたメリスコピックテープ単分子膜の臨界凝集—AFM と XPS による研究—科技园分子転写プロ 〇佐野 正人・神野 あゆみ・新海 征治
- II Pe099 3017 末端に種々の官能基を有するポリアミン酸集合体より成る受容体の構築—物質研 〇橋口 真弘・田口 和宏、名工大・科技园戦略基礎 木下 隆利
- II Pf100 3019 ポリオキシエチレン結合デンドロン型脂質の合成と物性—早大理工総研 〇宗 慶太郎・大川 春樹・武岡 真司・土田 英俊
- II Pe101 3021 ポリオキシエチレン結合デンドロン型脂質の分子集合—早大理工総研 〇武岡 真司・遠藤 太郎・宗 慶太郎・土田 英俊
- II Pf102 3023 タンパク質結合デンドロン型脂質による水溶性タンパク質の固定化—早大理工総研 〇大川 春樹・武岡 真司・土田 英俊
- II Pe103 3025 機能性高分子を表面に有するリボソームの特性解析—富山大工 〇住 祐祐・石野 友季子・矢部 和宏・田川 幸二・北野 博巳
- II Pf104 3027 細胞の熱分析 [II]—大阪工大 〇沼 俊介・馬場 義博・影本 彰弘

# HPE085 Antisense DNA 内包ポリイオンコンプレックスミセルの構築 -SS 結合による内核安定化効果-

東大院工 ○柿澤資訓・原田敦史・片岡一則

## 【緒言】

我々は、これまでに antisenseDNA と poly(ethyleneglycol)(PEG) と poly(L-lysine) (PLL) のブロック共重合体 (PEG-PLL) から形成された高分子ミセルを薬物運搬体としての利用することを検討してきた(1)。この高分子ミセルは、polyanion である antisenseDNA と polycation である PLL の間に働く静電引力によって形成され、ポリイオンコンプレックスミセルと呼ばれている。高分子ミセルを薬物運搬体として用いる利点として、水溶性で生体適合性の高い PEG 鎖の外殻が antisenseDNA を保持している内核を覆っているため、酵素による分解を回避することや、その特異的なサイズにより生体の排除機構を逃れるステルス性を持つことが期待できる。一方、高分子ミセルは希釈や塩濃度に対する安定性に問題があり、血流中では血清タンパク質との相互作用も考えられるため、ミセルの安定化が必要である。さらに、薬効発現のためには標的部位で内包された薬品を効率的に放出しなければならない。そこで、本研究では、これらの必要とされる性質を高分子ミセルに付与するため、PEG-PLL の lysine block に thiol 基を導入し、高分子ミセルの内核を SS 結合で架橋することを試みた。SS 結合は血流中では安定であり、還元的環境である細胞内で開裂することが期待される。この性質により、高分子ミセルは血中で安定に存在し、標的の細胞内では解離し、内包された薬物を放出することが期待できる。本発表では、SH 基を導入した PEG-PLL の合成と、核酸のモデル高分子として使用した poly(aspartic acid) (P(Asp)) を内包した高分子ミセルの調製と特性解析について報告する。

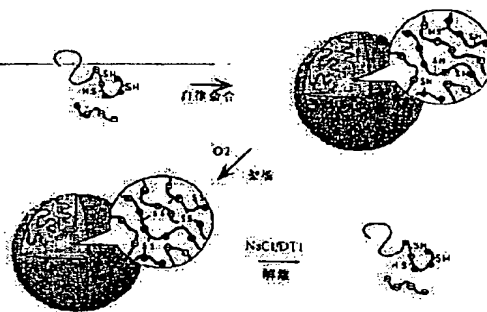


図 1. ミセル内核の SS 架橋

## 【実験】

### PEG-PLL の lysine 側鎖への thiol 基の導入

PEG-PLL への thiol 基の導入は、ヘテロ二官能性試薬 N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP) を用いて行った。PEG-PLL は PEG 分子量 5,000、poly(lysine) の重合度 22 のものを、透析により対イオンを臭素イオンから酢酸イオンに交換して用いた。5wt% の LiCl を加えた N-methylpyrrolidone に溶解させた PEG-PLL、SPDP 溶液を混合し、アミノ基を脱プロトン化するために三級アミン(DIEA)を添加した後、室温で攪拌し反応させた。反応の追跡は逆相クロマトグラフィー(RPLC)で行った。生成物は、MeOH/Ether 再沈を繰り返した後、水に対して透析し精製した。合成後、<sup>1</sup>H-NMR 測定および UV 測定によって、精製及び構造の確認、導入率の決定をした。

Sequential design of polyanion complex micelles entrapping antisense DNA. Stabilization by cross-linking of the core through disulfide bond

Yoshinori Kakizawa, Atsushi Harada, Kazunori Kataoka

(Department of Materials Science, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan) Tel: 03-5841-7145 FAX: 03-5841-7139 e-mail: kakizawa@bmw.mri.tu-tokyo.ac.jp

### PEG-PLL-thiol との PIC micelle 形成および特性解析

PEG-PLL-PDP を還元剤 DTT によって thiol 化した後、poly(aspartic acid)(重合度 15)溶液を、電荷の比が 1 となるように添加し、高分子ミセルを形成させた。その後、緩衝液に対して数日間透析することにより、不純物の除去および空気中の酸素による架橋反応を行った。形成されたミセルの構造および特性の解析は、静的および動的光散乱法によって行った。架橋によるミセルの安定化は、NaCl 濃度に対する安定性を静的光散乱法により見かけの分子量を求めることによって評価した。

#### 【結果及び考察】

#### PEG-PLL の lysine 側鎖への thiol の導入

RPLC 及び  $^1\text{H-NMR}$  測定の結果から、PEG-PLL の lysine 側鎖への PDP 基の導入が確認された。収率は約 69%であり、UV スペクトルと NMR スペクトルから決定した導入量は、それぞれ、高分子鎖一本当たり 6.7 および 6.8 となり、lysine 残基に対する導入率は約 30%であった。また、未反応のアミノ基は約 15 であった。

#### PEG-PLL-thiol と P(Asp) の PIC micelle 形成および特性解析

Lysine block への thiol 基の導入後も、PEG-PLL と P(Asp)は pH7.4 の緩衝溶液中でミセルを形成することが光散乱測定によって確かめられた。ミセル溶液に対して動的光散乱測定(DLS)を行い、ヒストグラム法により解析をした結果、ミセルの粒径分布は比較的狭く、ユニモーダルであることが示された(図 2)。同じく DLS の結果をキュムラント法により解析したところ、多分散度は 0.08、ミセルの流体力学的半径は 16 nm と求められた。また、ミセル粒径の測定角度依存性はなく、ミセルが球形であることが示唆された。内核架橋によるミセルの安定性は、NaCl 濃度に対するミセルの見かけの分子量の変化を静的光散乱法で測定することにより評価した(図 3)。thiol 基を導入していない PEG-PLL からなる高分子ミセルは、NaCl 濃度の増加にともないポリマー間の静電相互作用が遮蔽されるため、分子量の急激な減少がみられ、NaCl 濃度が 0.3M においてはほぼ解離した状態であると考えられる。それに対し、架橋したミセルでは NaCl 濃度に対する見かけの分子量の変化は小さく、ミセルの安定化が起きていることが確認された。また、NaCl 濃度 0.3 M の架橋ミセル溶液に、SS 結合の還元剤である DTT を添加したところ、ミセルの解離する挙動がみられ、安定化が SS 結合の形成によるものであることが明らかとなった。

1) K. Kataoka, H. Togawa, A. Harada, K. Yasugi, T. Matsumoto, S. Katayose, *Macromolecules* 1996, 29, 8556

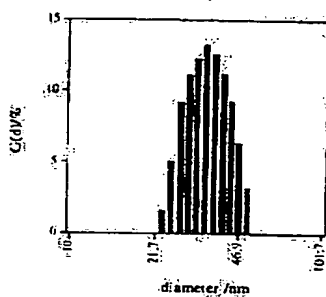


図 2. ミセルの粒径分布

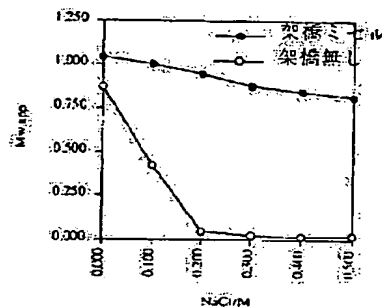


図 3. ミセルの塩濃度に対する安定性

# 第48回高分子討論会運営委員会

## 《運営委員長》

及川 栄蔵

新潟大学工学部

## 《副運営委員長》

坪川 紀夫

新潟大学工学部

## 《運営委員》

高木 俊樹

新潟大学工学部

飯田 高三

新潟大学工学部

池田 功夫

福井大学工学部

石井 正雄

株式会社 クラレ

五十野善信

長岡技術科学大学

川上 雄資

北陸先端科学技術大学院大学

北野 博巳

富山大学工学部

塩見 友雄

長岡技術科学大学

鈴木 秀松

長岡技術科学大学

竹内 茂弥

富山大学教育学部

早川 和久

信越化学工業株式会社

宮内信之助

長岡技術科学大学

宮下 徳治

東北大学反応化学研究所

## 《プログラム委員》

小林 高臣

長岡技術科学大学

竹中 克彦

長岡技術科学大学

## 高分子学会予稿集

48巻 (1999)

第12号=生体高分子、高分子における分子

シンクロナイゼーション

超分子構造の精密構築と機能の発現、

糖鎖高分子

(無断で複製・転載を禁じます)

©1999 The Society of Polymer Science, Japan

平成11年9月20日発行

## 第48回高分子討論会

会 期=平成11年10月6日～10月8日

会 場 新潟大学 五十二風キャンパス

発行所=社団法人 高分子学会

〒104-0042

東京都中央区入船 8-10-9

入船 32 藤ビル

電話 03-5540-3770

印刷所=株式会社 国際文献印刷社

特平 1 1 - 3 3 0 0 6 5

## 認 定 ・ 付 加 情 報

特許出願の番号	平成 1 1 年 特許願 第 3 3 0 0 6 5 号
受付番号	1 9 9 2 2 5 0 0 1 1 6
書類名	新規性の喪失の例外証明書提出書
担当官	兼崎 貞雄 6 9 9 6
作成日	平成 1 2 年 2 月 1 7 日

### < 認定情報・付加情報 >

#### 【提出された物件の記事】

新規性喪失の例外証明書 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [597144679]

- |          |                 |
|----------|-----------------|
| 1. 変更年月日 | 1997年 9月26日     |
| [変更理由]   | 新規登録            |
| 住 所      | ◇◇              |
| 氏 名      | ナノキャリア株式会社      |
| 2. 変更年月日 | 2000年 2月18日     |
| [変更理由]   | 住所変更            |
| 住 所      | 千葉県柏市柏の葉5丁目4番地6 |
| 氏 名      | ナノキャリア株式会社      |
-

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**